

26.3.2004

Rec'd PCT/PTO 26 SEP 2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10/550711

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年 3月 27日

RECEIVED

15 APR 2004

出願番号 Application Number: 特願 2003-088631

WIPO PCT

[ST. 10/C]: [JP 2003-088631]

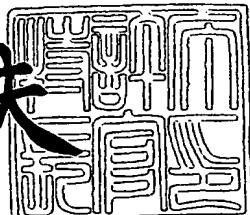
出願人 Applicant(s): サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 3月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 1033510
【提出日】 平成15年 3月27日
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿
【国際特許分類】 A61K 31/123
【発明の名称】 脂質改善剤及び脂質改善剤を含んでなる組成物
【請求項の数】 49
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006
【氏名】 秋元 健吾
【発明者】
【住所又は居所】 京都府南区吉祥院嶋出在家町36
【氏名】 深見 治
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県清水市川原町21番11号
【氏名】 合田 敏尚
【特許出願人】
【識別番号】 000001904
【氏名又は名称】 サントリー株式会社
【代理人】
【識別番号】 100077517
【弁理士】
【氏名又は名称】 石田 敬
【電話番号】 03-5470-1900
【選任した代理人】
【識別番号】 100092624
【弁理士】
【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9718791

【包括委任状番号】 9909459

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂質改善剤及び脂質改善剤を含んでなる組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る脂質改善剤。

【請求項 2】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る請求項 1 に記載の脂質改善剤。

【請求項 3】 前記高度不飽和脂肪酸がオメガ6系不飽和脂肪酸である、請求項 1 又は 2 に記載の脂質改善剤。

【請求項 4】 前記オメガ不飽和脂肪酸がアラキドン酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の脂質改善剤。

【請求項 5】 トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを產生する事のできる微生物を培養して得られた油脂を含んで成る請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の脂質改善剤。

【請求項 6】 前記記載の微生物がモルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の脂質改善剤。

【請求項 7】 前記高度不飽和脂肪酸がオメガ3系不飽和脂肪酸である、請求項 1 又は 2 に記載の脂質改善剤。

【請求項 8】 前記高度不飽和脂肪酸がオメガ9系不飽和脂肪酸である、請求項 1 又は 2 に記載の脂質改善剤。

【請求項 9】 前記オメガ6系不飽和脂肪酸が、9,12-オクタデカジエン酸 (リノール酸) 18:2 ω 6、6,9,12-オクタデカトリエン酸 (γ -リノレン酸) 18:3 ω 6、8,11,14-エイコサトリエン酸 (ジホモ- γ -リノレン酸) 20:3 ω 6、5,8,11,14-エイコサテトラエン酸 (アラキドン酸) 20:4 ω 6、7,10,13,16-ドコサテトラエン酸22:4 ω 6又は4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸22:5 ω 6である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の脂質改善剤。

【請求項 10】 前記オメガ3系不飽和脂肪酸が、9,12,15-オクタデカトリエン酸 (α -リノレン酸) 18:3 ω 3、6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸 (ステア

リドン酸) 18:4 ω 3、11, 14, 17-エイコサトリエン酸(ジホモ- α -リノレン酸) 20:3, ω 3、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸 20:4 ω 3、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸 20:5 ω 3、7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸 22:5 ω 3又は4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸 22:6 ω 3である、請求項1、2又は7に記載の脂質改善剤。

【請求項11】 前記オメガ9系不飽和脂肪酸が、6,9-オクタデカジエン酸 18:2 ω 9、8, 11-エイコサジエン酸 20:2 ω 9又は5, 8, 11-エイコサトリエン酸(ミード酸) 20:3 ω 9である、請求項1、2又は8記載の脂質改善剤。

【請求項12】 前記飽和脂肪酸及びモノ不飽和脂肪酸が、オクタン酸(カプリル酸) 8:0、デカン酸(カプリン酸) 10:0、ドデカン酸(ラウリル酸) 12:0、テトラデカン酸(ミリスチン酸) 14:0、ヘキサデカン酸(パルミチン酸) 16:0、オクタデカン酸(ステアリン酸) 18:0、9-オクタデカノイン酸(オレイン酸) 18:1 ω 9、アラキジン酸 20:0又はベヘン酸 22:0から選ばれたものであり、1位及び3位に結合する脂肪酸は同一か、あるいは組合せたものである、請求項2に記載の脂質改善剤。

【請求項13】 前記トリグリセリドが、1,3-ジパルミトイール-2-アラキドノイルグリセリド(16:0-20:4 ω 6-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタノイルグリセリド(16:0-20:5 ω 3-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサノイルグリセリド(16:0-22:6 ω 3-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド(16:0-20:3 ω 6-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-ミードノイルグリセリド(16:0-20:3 ω 9-16:0)、1,3-ジカプリトイール-2-アラキドノイルグリセリド(8:0-20:4 ω 6-8:0)、1,3-ジカプリトイール-2-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタノイルグリセリド(8:0-20:5 ω 3-8:0)、1,3-ジカプリトイール-2-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサノイルグリセリド(8:0-22:6 ω 3-8:0)、1,3-ジカプリトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド(8:0-20:3 ω 6-8:0)、1,3-ジカプリトイール-2-ミードノイルグリセリド(8:0-20:3 ω 9-8:0)、1,3-ジオレオイル-2-アラキドノイルグリセリド(18:1 ω 9-20:4 ω 6-18:1 ω 9)、1,3-ジオレオイル-2-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタノイルグリセリド(18:1 ω 9-20:5 ω 3-18:1 ω 9)、1,3-オレオイル-2-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサ

ヘキサノイルグリセリド (18:1 ω 9-22:6 ω 3-18:1 ω 9) 、 1,3-ジオレオイル-2-ジホモ- γ -リノイルグリセリド (18:1 ω 9-20:3 ω 6-18:1 ω 9) 及び/又は1,3-ジオレオイル-2-ミードノイルグリセリド (18:1 ω 9-20:3 ω 9-18:1 ω 9) から選ばれたものである、請求項1～12のいずれか1項に記載の脂質改善剤。

【請求項14】 血液中の中性脂肪 (トリグリセリド) 及び/又はコレステロールを低下させることを特徴とする請求項1に記載の脂質改善剤。

【請求項15】 血液中のHDL-コレステロールを増加させる、請求項1に記載の脂質改善剤。

【請求項16】 蓄積体脂肪を燃焼させる、請求項1に記載の脂質改善剤。

【請求項17】 食事性脂肪を燃焼させる、請求項1に記載の脂質改善剤。

【請求項18】 核内レセプター型転写因子 (PPAR) を介する、請求項1に記載の脂質改善剤。

【請求項19】 核内レセプター型転写因子が肝臓のPPAR α であり、PPAR α 及び/又は関連遺伝子発現を高める、請求項1又は14に記載の脂質改善剤。

【請求項20】 前記関連遺伝子が肝臓 β 酸化遺伝子であることを特徴とする請求項1、18又は19記載の脂質改善剤。

【請求項21】 核内レセプター型転写因子が脂肪組織のPPAR γ であり、PPAR γ 及び/又は関連遺伝子発現を抑制する、請求項1、18又は19に記載の脂質改善剤。

【請求項22】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る、脂質改善作用を有する組成物。

【請求項23】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る、脂質改善作用を有する請求項22に記載の組成物。

【請求項24】 前記高度不飽和脂肪酸がオメガ6系不飽和脂肪酸である、請求項22又は23に記載の組成物。

【請求項25】 前記オメガ不飽和脂肪酸がアラキドン酸である、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】 トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合したトリグリ

セリドを產生する事のできる微生物を培養して得られた油脂を含んで成る、請求項22～25のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項27】 前記記載の微生物がモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物である、請求項22～26のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項28】 前記高度不飽和脂肪酸がオメガ3系不飽和脂肪酸である、請求項22又は23に記載の組成物。

【請求項29】 前記高度不飽和脂肪酸がオメガ9系不飽和脂肪酸である、請求項22又は23に記載の組成物。

【請求項30】 前記オメガ6系不飽和脂肪酸が、9,12-オクタデカジエン酸(リノール酸) 18:2 ω 6、6,9,12-オクタデカトリエン酸(γ-リノレン酸) 18:3 ω 6、8,11,14-エイコサトリエン酸(ジホモ-γ-リノレン酸) 20:3 ω 6、5,8,11,14-エイコサテトラエン酸(アラキドン酸) 20:4 ω 6、7,10,13,16-ドコサテトラエン酸22:4 ω 6又は4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸22:5 ω 6である、請求項22～24のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項31】 前記オメガ3系不飽和脂肪酸が、9,12,15-オクタデカトリエン酸(α-リノレン酸) 18:3 ω 3、6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸(ステアリドン酸) 18:4 ω 3、11,14,17-エイコサトリエン酸(ジホモ-α-リノレン酸) 20:3 ω 3、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸20:4 ω 3、5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸20:5 ω 3、7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸22:5 ω 3又は4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸22:6 ω 3である、請求項23に記載の組成物。

【請求項32】 前記オメガ9系不飽和脂肪酸が、6,9-オクタデカジエン酸18:2 ω 9、8,11-エイコサジエン酸 20:2 ω 9又は5,8,11-エイコサトリエン酸(ミード酸) 20:3 ω 9である、請求項29に記載の組成物。

【請求項33】 前記飽和脂肪酸及びモノ不飽和脂肪酸が、オクタン酸(カプリル酸) 8:0、デカン酸(カプリン酸) 10:0、ドデカン酸(ラウリル酸) 12:0、テトラデカン酸(ミリスチン酸) 14:0、ヘキサデカン酸(パルミチン酸) 16:0、オクタデカン酸(ステアリン酸) 18:0、9-オクタデカノイン酸(オレイン酸) 18:1 ω 9、アラキジン酸20:0又はベヘン酸22:0から選ばれたものであり、1位及び3位に結合する脂肪酸は同一か、あるいは組合せたものである請求項23に記載

の組成物。

【請求項34】 前記トリグリセライドが、トリグリセリド：1,3-ジパルミトイール-2-アラキドノイルグリセリド（16:0-20:4 ω 6-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（16:0-20:5 ω 3-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（16:0-22:6 ω 3-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド（16:0-20:3 ω 6-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-ミードノイルグリセリド（16:0-20:3 ω 9-16:0）、1,3-ジカプリトイール-2-アラキドノイルグリセリド（8:0-20:4 ω 6-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（8:0-20:5 ω 3-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（8:0-22:6 ω 3-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド（8:0-20:3 ω 6-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-ミードノイルグリセリド（8:0-20:3 ω 9-8:0）、1,3-ジオレオイル-2-アラキドノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:4 ω 6-18:1 ω 9）、1,3-ジオレオイル-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:5 ω 3-18:1 ω 9）、1,3-オレオイル-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（18:1 ω 9-22:6 ω 3-18:1 ω 9）、1,3-ジオレオイル-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:3 ω 6-18:1 ω 9）及び/又は1,3-ジオレオイル-2-ミードノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:3 ω 9-18:1 ω 9）から選ばれたものである、請求項22～33のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項35】 血液中の中性脂肪（トリグリセリド）及び/又はコレステロールを低下させる、請求項22に記載の組成物。

【請求項36】 血液中のHDL-コレステロールを増加させる、請求項22に記載の組成物。

【請求項37】 蓄積体脂肪を燃焼させる、請求項22に記載の組成物。

【請求項38】 食事性脂肪を燃焼させる、請求項22に記載の組成物。

【請求項39】 核内レセプター型転写因子（PPAR）を介する、請求項22に記載の組成物。

【請求項40】 核内レセプター型転写因子が肝臓のPPAR α であり、PPAR α

及び/又は関連遺伝子発現を高める、請求項22又は38に記載の組成物。

【請求項41】 前記関連遺伝子が肝臓 β 酸化遺伝子である、請求項22、23又は39に記載の組成物。

【請求項42】 核内レセプター型転写因子が脂肪組織のPPAR γ であり、PPAR γ 及び/又は関連遺伝子発現を抑制する、請求項22又は38に記載の組成物。

【請求項43】 組成物が、食品組成物又は医薬組成物である請求項1～41のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項44】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの成人1日当たりの摂取量が、高度不飽和脂肪酸量に換算して0.001～20gとなるように、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る食品組成物。

【請求項45】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの成人1日当たりの摂取量が、高度不飽和脂肪酸量に換算して0.001～20gとなるように、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る請求項43に記載の食品組成物。

【請求項46】 トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの成人1日当たりの摂取量が、アラキドン酸量に換算して0.001～20gとなるように、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る請求項43又は44に記載の食品組成物。

【請求項47】 前記トリグリセリドが、1,3-ジパルミトイール-2-アラキドノイルグリセリド(16:0-20:4 ω 6-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド(16:0-20:5 ω 3-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド(16:0-22:6 ω 3-16:0)、1,3-ジパルミトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド(16:0-20:3 ω 6-16:0)

、1,3-ジパルミトイール-2-ミードノイルグリセリド（16:0-20:3 ω 9-16:0）、1,3-ジカプリトイール-2-アラキドノイルグリセリド（8:0-20:4 ω 6-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（8:0-20:5 ω 3-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（8:0-22:6 ω 3-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-ジホモ- γ -リノイルグリセリド（8:0-20:3 ω 6-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-ミードノイルグリセリド（8:0-20:3 ω 9-8:0）、1,3-ジオレオイル-2-アラキドノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:4 ω 6-18:1 ω 9）、1,3-ジオレオイル-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:5 ω 3-18:1 ω 9）、1,3-オレオイル-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（18:1 ω 9-22:6 ω 3-18:1 ω 9）、1,3-ジオレオイル-2-ジホモ- γ -リノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:3 ω 6-18:1 ω 9）及び/又は1,3-ジオレオイル-2-ミードノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:3 ω 9-18:1 ω 9）から選ばれたものである組成物を0.001重量%以上含有する請求項43又は45に記載の食品組成物。

【請求項48】 食品組成物が、機能性食品、栄養補助食品、特定保健用食品又は老人用食品である請求項43～46のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項49】 脂質改善作用を有する組成物の製造方法であって、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを単独であるいは組み合わせて、また、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを実質的に含有しない、あるいは含有していても僅かな量である食品原料とともに配合することを特徴とする食品組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定の脂肪酸が特定の位置に存在する、高度不飽和脂肪酸を含んで成る新規な脂質改善剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

脂肪は、蛋白質、糖質とともに重要な栄養素で、特に高エネルギー源として有用であるとともに高カロリー (9kcal/g) であり、肥満を助長し生活習慣病などの問題を引き起こす原因となる。実際に高脂血症（高コレステロール血症、高トリグリセリド血症）を認めた場合には、第一の治療法には食事療法が用いられ、適切な食事療法、運動療法を指導することにより、しばしば改善に向かい、正常化する場合もある。しかしながら、脂肪は嗜好を高めることから、現代人は脂肪を多く含む食事を摂取し、飽食状態にある先進諸国においては脂肪の取り過ぎが問題となっている。

【0003】

高トリグリセリド血症の多くは、過食、運動不足、肥満、アルコール過飲の結果であることから、同時に高血圧や糖尿病を合併している場合が多い。したがって、危険因子が重複する場合や日常の生活習慣の改善が困難な場合が多く、虚血性心疾患の発症を防ぐために、積極的な薬物療法を行う場合が増加している。

高トリグリセリド血症に対する薬物として、フィブラーント系薬物（日本では第二世代のフィブラーント系薬剤としてベザフィブレート（ベザトールSR^R、ベザリップ^R）、フェノフィブレート（リパンチル^R）が知られている）がある。フィブラーント系薬物の主な作用機序は、核内レセプター型転写因子 α (PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor α) の活性化を介することにある。

【0004】

そのため脂肪酸の β 酸化が亢進して肝臓トリグリセリド生成は低下し、結果としてVLDL-TG生成が抑制される。また、PPAR α の活性化はLPL活性を高め、トリグリセリド rich リポ蛋白の異化が亢進される。また、アポAI、AIIの生成増加やアポCIIIの生成抑制が惹起させる。その他、フィブラーント系薬剤には肝臓でのコレステロールの合成抑制、インスリン感受性亢進、さらに胆汁へのコレステロール排泄亢進作用もあるとされている。この結果としてフィブラーント系薬剤は血清トリグリセリド値を20-50%低下させ、HDL-コレステロールを10-15%上昇させる。

【0005】

他の薬剤として、ニコチン酸製剤（ニセリトロール（ペリシット^R）、ニ

コモール（コレキサミンR）が高トリグリセリド血症及び混合型高脂血症（高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、低HDL-コレステロール血症を伴う）に対して有用性が認められている。ニコチン系薬剤の主な作用機序は、脂肪酸合成阻害、脂肪酸の肝臓への動員抑制、かつ肝臓脂肪酸のエステル化抑制にて肝臓トリグリセリドを低下させる。現在、フィブロート系薬物が第一選択薬として使用されているが、薬物療法は、肝機能障害、腎機能障害、ミオパチーなどの副作用の発現に留意する必要がある。また、薬物の副作用のほとんどは投与開始後6ヶ月以内に発現するため、投与開始あるいは増量後の6ヶ月、少なくとも3-4ヶ月間は薬物の効果検定とともに副作用の発生に注意が必要となる。したがって、摂取には細心の注意が必要で、予防的に摂取することはできなかった。

【0006】

現在、予防的な手立てとして、油脂代替物、非吸収性油脂の開発がなされており、なかでも代表的なものとして、ショ糖脂肪酸ポリエステル（米国特許第3600186号）が挙げられる。これは体内で吸収されずに排泄されるため油脂由来のカロリーは0kcal/gであるが、脂溶性ビタミンの吸収が阻害されると併に、必須脂肪酸の供給源とはならず常用する油脂とはなりえなかった。そこで、近年、必須脂肪酸の供給源としての機能を考慮したものとしてジアシルグリセロールが開発された。

【0007】

開発されたジアシルグリセロールは、トリグリセリドの1,3-位に脂肪酸が主として結合したもので、吸収に際して1,3-位特異的酵素リバーゼにより脂肪酸が切り出され、グリセロールと脂肪酸となって腸管吸収されるが、小腸上皮細胞でトリグリセリドに再構築されず門脈吸収されて直接肝臓に運ばれるため脂肪蓄積を抑制する（トリグリセリドの場合は、2-アシルモノグリセロールと脂肪酸で腸管吸収され、小腸上皮細胞でトリグリセリドに再構築され、カイロミクロンに取り込まれてリンパへ分泌して抹消組織を回る）。

【0008】

しかし、いずれの開発された油脂も、薬剤の効果のように積極的に体内で脂肪を燃焼（ β 酸化）させることはなく、効果も限定的であった。また、吸収抑制を

目的とした脾臓リバーゼの阻害剤も開発されているが、これも効果は限定的と言わざる負えなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

したがて、脂質改善作用を示し、さらには食品への適応に優れた副作用の少ない化合物の開発が強く望まれている。

【0010】

【課題を解決するための手段】

従って本発明等は、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを有効成分とする、脂質改善剤、脂質改善作用を有する飲食品及びその製造法を提供しようとするものである。

【0011】

より詳細には、トリグリセリドの2-位にオメガ6系、オメガ3系又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド及さらには、トリグリセリドの2-位にオメガ6系、オメガ3系又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に炭素数8以上の飽和及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドから選ばれた少なくとも1種を有効成分とし、脂質改善作用、具体的には血液中の中性脂肪（トリグリセリド）及び/又はコレステロールを低下、血液中のHDL-コレステロールを増加、蓄積体脂肪を燃焼（ β 酸化亢進）、食事性脂肪を燃焼（ β 酸化亢進）、核内レセプター型転写因子である肝臓のPPAR α 及び/又は関連遺伝子（例えば肝臓 β 酸化酵素遺伝子）発現を高め、脂肪組織のPPAR γ 及び/又は関連遺伝子発現を抑制する脂質改善剤、飲食品及びその製造方法を提供しようとするものである。

【0012】

本発明者等は、高トリグリセリド血症の第一選択薬であるフィブロート系薬物の作用メカニズムとなる脂質代謝に関する核内レセプター型転写因子（PPAR）を活性化する成分のスクリーニングを実施した。油脂はその摂取に伴い、小腸上

皮細胞ではPPAR α mRNAの発現を高め、脂肪酸及びビタミンAの吸収を促進し、肝臓ではPPAR α mRNAの発現を高め、脂肪酸の β 酸化を亢進することが知られている。さらに、このPPARのリガンドには、飽和脂肪酸及びモノ不飽和脂肪酸より高度不飽和脂肪酸が有効であることが知られている。そこで、本発明者等は、PPARを活性化させる安全な天然成分として高度不飽和脂肪酸に着目した。

【0013】

油脂は吸収される際、1,3-位特異的臍リパーゼで1,3-位に結合した脂肪酸が切り出されることから、トリグリセリドの1,3-位に高度不飽和脂肪酸を結合させたトリグリセリドが理想的なトリグリセリド構造と鋭意研究を進めたところ、驚くべきことにトリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの方がPPARをより活性化することを発見した。2-位に結合した高度不飽和脂肪酸は1,3-位特異的臍リパーゼで切り出されないことから、ほとんどPPARを活性化することはないと予想したのとは全く逆の結果となり、従来にない事実を発見した。

【0014】

従って発明者等は、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを有効成分とする、脂質改善剤、脂質改善作用を有する飲食品及びその製造法を提供しようとするものである。

【0015】

より詳細には、トリグリセリドの2-位にオメガ6系、オメガ3系又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位にオメガ6系、オメガ3系又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に炭素数8以上の飽和及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドから選ばれた少なくとも1種を有効成分とし、脂質改善作用、具体的には血液中の中性脂肪（トリグリセリド）及び/又はコレステロールを低下、血液中のHDL-コレステロールを増加、蓄積体脂肪を燃焼（ β 酸化亢進）、食事性脂肪を燃焼（ β 酸化亢進

）、核内レセプター型転写因子である肝臓のPPAR α 及び/又は関連遺伝子（例えば肝臓 β 酸化酵素遺伝子）発現を高め、脂肪組織のPPAR γ 及び/又は関連遺伝子発現を抑制する脂質改善剤、飲食品及びその製造方法を提供しようとするものである。

【0016】

本発明により、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを有効成分とする、脂質改善剤、脂質改善作用を有する飲食品及びその製造方を提供しようとすることができ、現代社会の人類において特に有用である。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明は、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを有効成分とする、脂質改善剤、脂質改善作用を有する飲食品及びその製造方法に関するものである。

【0018】

本発明の化合物及び該化合物を含んでなる組成物は、脂質改善作用、具体的には中性脂肪（トリグリセリド）及び/又はコレステロールを低下、血液中のHDL-コレステロールを増加、蓄積体脂肪を燃焼（ β 酸化亢進）、食事性脂肪を燃焼（ β 酸化）、さらに、メカニズム的には、肝臓では核内レセプター型転写因子のPPAR α 及び/又は関連遺伝子（例えば、アシルCoAオキシダーゼを始めする β 酸化系酵素、脱共役蛋白質（UAP-2）など）の発現を高め、脂肪酸合成酵素（FAS）遺伝子発現を抑制し、脂肪細胞ではPPAR γ 及び/又は関連遺伝子（例えば、脂肪細胞特異的脂肪結合蛋白質（aP2）、脱共役蛋白質（UAP-2）など）発現を抑制し、アシルCoAオキシダーゼを始めとする β 酸化系酵素及び/又は脱共役蛋白質（UAP-2）遺伝子の発現を高め、脂肪酸合成酵素（FAS）遺伝子の発現を抑制する予防又は改善を目的とする飲食品、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、乳幼児用

食品、老人用食品、医薬品、医薬外品などとして有効である。

【0019】

本発明の化合物は、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを利用することができる。

【0020】

2-位に結合する高度不飽和脂肪酸は具体的には、オメガ6系不飽和脂肪酸（9,1-2-オクタデカジエン酸（リノール酸）18:2 ω 6、6,9,12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸）18:3 ω 6、8,11,14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）20:3 ω 6、5,8,11,14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）20:4 ω 6、7,10,13,16-ドコサテトラエン酸22:4 ω 6又は4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸22:5 ω 6など）、オメガ3系不飽和脂肪酸（9,12,15-オクタデカトリエン酸（ α -リノレン酸）18:3 ω 3、6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）18:4 ω 3、11,14,17-エイコサトリエン酸（ジホモ- α -リノレン酸）20:3, ω 3、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸20:4 ω 3、5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸20:5 ω 3、7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸22:5 ω 3又は4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸22:6 ω 3など）及びオメガ9系不飽和脂肪酸（6,9-オクタデカジエン酸18:2 ω 9、8,11-エイコサジエン酸20:2 ω 9又は5,8,11-エイコサトリエン酸（ミード酸）20:3 ω 9など）を挙げることができるが、

【0021】

これらに限定しているわけではなく、炭素数18以上、二重結合を2以上有する高度不飽和脂肪酸であればすべて使用することができる。また、1,3-位に結合する飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸は、オクタン酸（カプリル酸）8:0、デカカン酸（カプリン酸）10:0、ドデカン酸（ラウリル酸）12:0、テトラデカン酸（ミリスチン酸）14:0、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）16:0、オクタデカン酸（ステアリン酸）18:0、9-オクタデカノイン酸（オレイン酸）18:1 ω 9、アラキジン酸20:0又はベヘン酸22:0を挙げることができるが、これらに限定しているわけなく、炭素数8以上の飽和脂肪酸及びモノ不飽和脂肪酸であればすべて使用する

ことができる。当然、1位及び3位に結合する脂肪酸は同一から、あるいは組合せて使用することができる。

【0022】

具体的な化合物として、トリグリセリド：1,3-ジパルミトイール-2-アラキドノイルグリセリド（16:0-20:4 ω 6-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（16:0-20:5 ω 3-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（16:0-22:6 ω 3-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド（16:0-20:3 ω 6-16:0）、1,3-ジパルミトイール-2-ミードノイルグリセリド（16:0-20:3 ω 9-16:0）、1,3-ジカプリトイール-2-アラキドノイルグリセリド（8:0-20:4 ω 6-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（8:0-20:5 ω 3-8:0））、

【0023】

1,3-ジカプリトイール-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（8:0-22:6 ω 3-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド（8:0-20:3 ω 6-8:0）、1,3-ジカプリトイール-2-ミードノイルグリセリド（8:0-20:3 ω 9-8:0）、1,3-ジオレオイル-2-アラキドノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:4 ω 6-18:1 ω 9）、1,3-ジオレオイル-2-5,8,11,14,17-エイコサペンタノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:5 ω 3-18:1 ω 9）、1,3-オレオイル-2-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサノイルグリセリド（18:1 ω 9-22:6 ω 3-18:1 ω 9）、

【0024】

1,3-ジオレオイル-2-ジホモ- γ -リノレノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:3 ω 6-8:1 ω 9）及び/又は1,3-ジオレオイル-2-ミードノイルグリセリド（18:1 ω 9-20:3 ω 9-18:1 ω 9）を挙げることができるが、これらに限定しているわけではなく、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドであればすべてを利用することができる。

【0025】

本発明の有効成分のひとつは、トリグリセリドの2-位に高度飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドであって、例えば次のような手法により調製することができる。

2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド具体的な製造法のひとつとして、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂（トリグリセリド）及び飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1,3-位のエステル結合にのみ作用するリバーゼを作用させることで製造することができる。

【0026】

原料となる油脂（トリグリセリド）は、オメガ6系高度不飽和脂肪酸、オメガ3系高度不飽和脂肪酸及び/又はオメガ3系高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドであり、トリグリセリドを構成する全脂肪酸に対する高度不飽和脂肪酸の割合が高い場合には、未反応油脂（原料トリグリセリド並びに1,3-位の脂肪酸のうち一方のみが飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸となったトリグリセリド）の増加による反応収率の低下を防ぐため、通常の酵素反応温度20-30℃より、高く30-50℃、好ましくは40-50℃とする。

【0027】

トリグリセリドの1,3-位のエステル結合に特異的に作用するリバーゼとして、例えば、リゾpus (Rhizopus) 属、リゾムコール (Rhizomucor) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属などの微生物が產生するもの、ブタ臍臍リバーゼなどを挙げることができる。かかるリバーゼについては、市販のものを用いることができる。例えば、リゾpus・デレマー (Rhizopus delemar) のリバーゼ（田辺製薬（株）製、タリバーゼ）、リゾムコール・ミーハイ (Rhizomucor miehei) のリバーゼ（ノボ・ノルディスク（株）社製、リボザイムIM）、アセペルギルス・ニガー (Apergillus niger) のリバーゼ（天野製薬（株）、リバーゼA）等が挙げられるが、これら酵素に限定しているわけではなく、1,3-位特異的リバーゼであればすべて使用することができる。

【0028】

上記リバーゼの使用形態は、反応効率を高める目的で反応温度を30℃以上、好

ましくは40℃以上とするため、酵素の耐熱性を付加する目的で固定化担体に固定化したリバーゼを使用することが望ましい。固定化担体として多孔室（ハイポーラス）樹脂であって、約100オングストローム以上の孔径を有するイオン交換樹脂担体、例えばDowex MARATHON WBA（商標、ダウケミカル）等が挙げられる。

固定化担体1に対して、1,3-位特異的リバーゼの水溶液0.5-20倍重量に懸濁し、懸濁液に対して2-5倍量の冷アセトン（例えば-80℃）を攪拌しながら徐々に加えて沈殿を形成させる。この沈殿物を減圧下で乾燥させて固定化酵素を調製することができる。

【0029】

さらに簡便な方法では、固定化担体1に対して、0.05-0.4倍量の1,3-位特異的リバーゼを最小限の水に溶解し、攪拌しながら固定化担体を混ぜ合わせ、減圧下で乾燥させて固定化酵素を調製することができる。この操作により約90%のリバーゼが担体に固定化されるが、このままではエステル交換活性は全く示さず、水1-10重量(W/V)%を加えた基質（原料油脂と中鎖脂肪酸）中で、好ましくは水1-3重量%を加えた基質中で前処理することで固定化酵素は最も効率よく活性化することができ製造に供することができる。

【0030】

酵素の種類によっては、本反応系に加える水分量は極めて重要で、水を含まない場合はエステル交換が進行しにくくなり、また、水分量が多い場合には加水分解が起り、グリセリドの回収率が低下する（加水分解が起ればジグリセリド、モノグリセリドが生成される）。しかし、この場合、前処理により活性した固定化酵素を使用することで、本反応系に加える水分量は重要ではなくなり、全く水を含まない系でも効率よくエステル交換反応を起こすことができる。さらに酵素剤の種類を選択することで前処理を省略することも可能である。

【0031】

このように、耐熱性を有する固定化酵素を使用し、酵素反応温度を上げることで、1,3-位特異的リバーゼに反応特異性が低い高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂（トリグリセリド）においても、反応効率を低下させることなく、2-位に高度飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が

結合したトリグリセリドを効率的に製造することができる。

【0032】

酵素反応の原料となる油脂（トリグリセリド）は、オメガ6系高度不飽和脂肪酸、オメガ3系高度不飽和脂肪酸及び/又はオメガ3系高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドであって、例えば、オメガ6系高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドでは、月見草油（9,12-オクタデカジエン酸（リノール酸）及び6,9,12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸））、ボラージ油（9,12-オクタデカジエン酸（リノール酸）及び6,9,12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸））を挙げることができる。さらに、5,8,11,14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）及び8,11,14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）を構成脂肪酸とするトリグリセリドを効率よく製造する方法が本発明者等によって開発されており（P86-0087、特開平5-91887号公報）、これら油脂を酵素反応の原料油脂として使用することができる。

【0033】

オメガ9系高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドでは、6,9-オクタデカジエン酸18:3 ω 9、8,11-エイコサジエン酸20:2 ω 9若しくは5,8,11-エイコサトリエン酸（ミード酸）20:3 ω 9を構成脂肪酸とするトリグリセリドを効率よく製造する方法が本発明者等によって開発されており（特開平5-91888号公報、特開平10-57085号公報、特開平5-91886号公報）、これら油脂を酵素反応の原料油脂として使用することができる。

【0034】

オメガ3系高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドでは、マグロ、カツオ、イワシ、サバ、サンマ、タラ、イカ、アジ等の魚油を酵素反応の原料油脂として使用することができる。なお、魚油にはトリグリセリドに結合する全脂肪酸がオメガ3系高度不飽和脂肪酸とは限らず、一部、オメガ6系高度不飽和脂肪酸も構成脂肪酸として結合している。オキアミ、そして、クロレラ、スピルナ等の藻類から抽出した油脂も酵素反応の原料油脂として使用することができる。

【0035】

さらに、4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸22:6 ω 3を構成脂肪酸とするト

リグリセリドを産生する微生物として知られている、クリプテコデニウム (Cryptocodium) 属、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 属、シゾキトリウム (Schizochytrium) 属、ウルケニア (Ulkenia) 属、ジャポノキトリウム (Japonochytorium) 属又はハリフォトリス (Haliphthoros) 属の微生物を培養して得られた油脂も酵素反応の原料油脂として使用することができる。

【0036】

原料となる飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸として、植物油脂から調製した飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸、炭素数8-12の中鎖脂肪酸を酵素反応の原料に使用することができる。また、原料は脂肪酸、脂肪酸塩、脂肪酸のアルコールエステル及び/又はトリグリセリドとして反応に供することができる。

本発明の活性成分が、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドであるが、オクタン酸（カプリル酸）8:0及び9-オクタデカノイン酸（オレイン酸）18:1 ω 9がPPAR遺伝子の発現を高めることがしら知られており、これら脂肪酸を1,3-位に結合させたトリグリセリドはより効果的な脂質改善剤と成り得る。

【0037】

酵素法で得られたトリグリセリドは、2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合した脂質改善作用を有するトリグリセリドが100%とはならないが、発明の主旨からして、該トリグリセリドを5モル%以上、好ましくは10モル%以上、さらに好ましくは20モル%以上、最も好ましくは30モル%以上含む油脂（トリグリセリド）も脂質改善作用を有するトリグリセリドであることは明らかである。

なお、2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドと得る方法として、酵素合成に限定しているわけではなく、化学合成を含めたあらゆる方法を使用できることは明らかである。

【0038】

脂質改善作用を有する組成物の製造法であって、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合

したトリグリセリドを単独で、あるいは組合わせて、また、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを実質的に含有しない、あるいは含有していても僅かな量である飲食品原料とともに配合することができる。ここで、僅かな量とは、飲食品原料にトリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドが含まれていたとしても、それを配合した食品組成物を人が摂取しても、後述する一日当たりの高度不飽和脂肪酸の摂取量に達していない量を意味する。

【0039】

本発明の化合物はトリグリセリドであり、その用途に関しては無限の可能性があり、食品、飲料、医薬品、医薬部外品の原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

【0040】

例えば、食品組成物としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊娠婦食品又は老人用食品等を挙げることができる。油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。さらに、油脂を含まない、農産食品、醸酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加することができる。さらに、機能性食品、医薬品、医薬部外品の形態であっても構わなく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってよい。

【0041】

また本発明の組成物は、本発明の有効成分以外に、一般に飲食品、医薬品または医薬部外品に用いられる各種担体や添加物を含んでいてよい。特に本発明の有効成分の酸化防止を防ぐ目的で抗酸化を含むことが望ましい。抗酸化剤として、

例えば、トコフェロール類、フラボン誘導体、フィロズルシン類、コウジ酸、没食子酸誘導体、カテキン類、フキ酸、ゴシポール、ピラジン誘導体、セサモール、グアヤオール、グアヤク酸、p-クマリン酸、ノールジヒドログアヤテッチク酸、ステロール類、テルペン類、核酸塩基類、カロチノイド類、リグナン類などのような天然抗酸化剤およびアスコルビン酸パルミチン酸エステル、アスコルビン酸ステアリン酸エステル、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、

【0042】

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、モノ-t-ブチルヒドロキノン(TBHQ)、4-ヒドロキシメイル-2,6-ジ-t-ブチルフェノール(HMBP)に代表されるような合成抗酸化剤を挙げることができる。トコフェロール類では、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、 δ -トコフェロール、 ϵ -トコフェロール、 ζ -トコフェロール、 η -トコフェロールおよびトコフェロールエステル(酢酸トコフェロール等)等を挙げることができる。さらに、カロチノイド類では、例えば、 β -カロチン、カンタキサンチン、アスタキサンチン等を挙げることができる。

【0043】

本発明の組成物は、本発明の有効成分以外に、担体として、各種キャリアー担体、イクステンダー剤、希釈剤、增量剤、分散剤、賦形剤、結合剤溶媒(例、水、エタノール、植物油)、溶解補助剤、緩衝剤、溶解促進剤、ゲル化剤、懸濁化剤、小麦粉、米粉、でん粉、コーンスター、ポリサッカライド、ミルクタンパク質、コラーゲン、米油、レシチンなどが挙げられる、添加剤としては、例えば、ビタミン類、甘味料、有機酸、着色剤、香料、湿化防止剤、ファイバー、電解質、ミネラル、栄養素、抗酸化剤、保存剤、芳香剤、湿润剤、天然の食物抽出物、野菜抽出物などを挙げることができるが、これらに限定しているわけではない。

【0044】

本発明の化合物はトリグリセリドの形態をしているが、活性本体は核内レセプター型転写因子(PPAR)のリガンドとなるトリグリセリドの2-位に結合する高度不飽和脂肪酸にある。たとえば、高度不飽和脂肪酸がアラキドン酸の場合には、

一日あたり食事からのアラキドン酸の摂取量は関東地区で0.14g、関西地区で0.19-0.20gとの報告があり（脂質栄養学4, 73-82, 1995）、相当量、さらにはそれ以上、アラキドン酸量を摂取目安とすることができます。

【0045】

したがって、本発明のトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの成人（例えば、体重60kgとして）一日当たりの摂取量は、アラキドン酸量に換算して、0.001g-20g、好ましくは0.01g-10g、より好ましくは0.05-5g、最も好ましくは0.1g-2gとする。また、一日あたりの5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸20:5ω3、7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸22:5ω3及び4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸22:6ω3ドコサヘキサエン酸の摂取量は、関東地区ではそれぞれ、0.15、0.05及び0.27-0.37、関西地区ではそれぞれ、0.35、0.12-0.14及び0.69-0.82との報告があり、相当量、さらにそれ以上を摂取目安とすることができます。

【0046】

本発明のトリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド並びに該トリグリセリドを含んでなる油脂（トリグリセリド）を実際に飲食品に適用する場合には、食品に配合する高度不飽和脂肪酸の絶対量も重要なとなる。

【0047】

ただし、飲食品に配合する絶対量も、配合する飲食品の摂取量によって変化することから、高度不飽和脂肪酸に換算して0.003重量%以上、好ましくは0.03重量%以上、より好ましくは0.3重量%以上となるように配合する。さらに、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合しトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを飲食品に配合する場合には、0.001重量%以上、好ましくは0.01重量%以上、より好ましくは0.1重量%以上とする。

【0048】

本発明の組成物を医薬品として使用する場合、製剤技術分野において慣用の方法、例えば、日本薬局方に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。

本発明の組成物を医薬品として使用する場合、組成物中の有効成分の配分量は、本発明の目的が達成される限り特に限定されず、適宜適当な配合割合で使用が可能である。

【0049】

本発明の組成物を医薬品として使用する場合、投与単位形態で投与するのが望ましく、特に、経口投与が好ましい。本発明の組成物の投与量は、年令、体重、症状、投与回数などにより異なるが、例えば、成人（約60kgとして）一日当たり本発明のトリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド、さらには、トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合し、1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを、高度不飽和脂肪酸量換算として、通常約0.001g～20g、好ましくは約0.01g～10g、より好ましくは約0.05～5g、最も好ましくは約0.1g～2gを一日1回～3回に分割して投与するのがよい。

【0050】

【実施例】

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、下記の実施例に限定されない。

実施例1. トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドの微生物による製造方法

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) を用いた。グルコース1.8%、脱脂大豆粉3.1%、大豆油0.1%、KH₂PO₄ 0.3%、Na₂SO₄ 0.1%、CaCl₂ · 2H₂O 0.05%及びMgCl₂ · 6H₂O 0.05%を含む培地6kLを、10kL培養槽に調製し、初発pHを6.0に調整した。前培養液30Lを接種し、温度26℃、通気量360m³/h、槽内圧200kPaの条件で8日間の通気搅拌培養を行った。なお、攪拌数は溶存酸素濃度を10-15ppmを維持するように調整した。

【0051】

さらに、グルコース濃度を4日目までは流加法によって培地中のグルコース濃度が1-2.5%の範囲内となるように、それ以降は0.5-1%を維持した（上記の%は、重量(W/V)%を意味する）。培養終了後、ろ過、乾燥によりアラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドを含有する菌体を回収し、得られた菌体からヘキサン抽出により油脂し、食用油脂の精製工程（脱ガム、脱酸、脱臭、脱色）を経て、アラキドン酸含有トリグリセリド（アラキドン酸はトリグリセリドの任意な位置に結合）150kgを得た。得られた油脂（トリグリセリド）をメチルエステル化し、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析したところ、全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合は40.84%であった。

【0052】

なお、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸などが、それぞれ11.63%、7.45%、7.73%、9.14%、2.23%、3.27%であった。なお、常法の分析によりトリグリセリドの2-位に占める高度不飽和脂肪酸の割合は91.5%であり、アラキドン酸の割合は64.7%であった。さらに、上記アラキドン酸含有油脂（トリグリセリド）をエチルエステル化し、アラキドン酸エチルエステルを40%含む脂肪酸エチルエステル混合物から、常法の高速液体クロマトグラフィーによって、99%アラキドン酸エチルエステルを分離・精製した。得られたアラキドン酸エチルエステルは常法のケン化反応によって遊離のアラキドン酸を調製した。

【0053】

実施例2. 1,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸(X)が、2-位に高度不飽和脂肪酸(P)が結合したトリグリセリド(XPX)及び1-位に高度不飽和脂肪酸(P)が、2,3-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸(X)が結合したトリグリセリド(PXX)或いは3-位に高度不飽和脂肪酸(P)が、1,2-位に飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸(X)が結合したトリグリセリド(XXP)の化学合成

【0054】

8A8 (1,3-ジオクタノイル-2-アラキドノイル-グリセリド) の合成

ジヒドロキシアセトン2量体1g (0.55mmol) を塩化メチレン20mlに溶解し、n-オクタン酸3.5ml (2.2mmol) およびジメチルアミノベンゼン70mgを加え、水冷下

WS-DCC4.6g (1.2mmol) を添加した。2時間後、濃縮し、酢酸エチルで抽出、水、1N-HCl、飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、得られた残渣を冷ヘキサンで結晶化し、3g (8.7mmol) の1,3-ジオクタノイルオキシアセトンを得た (79%収率)。

【0055】

このオクタン酸エステル10.8g (31.5mmol) をTHF120mlに溶解し、水8mlを加え、氷冷下強く攪拌し、ナトリウムボロハイドライド1.2g (31.7mmol) を少量ずつ、pHを酢酸で中性にしながら添加する。添加終了後、1N-HClで微酸性にした水を加え、酢酸エチルで抽出、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮する。得られた油状物質を塩化メチレン100mlに溶解し、ジメチルアミノベンゼン300mg、アラキドン酸8g (26.4mmol) を加え、氷冷する。さらにWS-DCC6.5g (34.4mmol) を加え、1時間攪拌する。

【0056】

反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出、水、1N-HCl、飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、得られた残渣をヘキサン-酢酸エチル (9:1) でシリカゲルクロマトし、油状物質の8A8の13.5gを得た (68%収率)。PMR (CDCl₃) δ: 0.8-1.0 (9H, m), 1.2-1.4 (22H, m), 1.6-1.8 (6H, m), 2.0-2.2 (4H, m), 2.3-2.4 (6H, m), 2.7-2.9 (6H, m), 4.14 (2H, q), 4.29 (2H, q), 5.2-5.5 (9H, m)。

【0057】

88A (1(3),2-ジオクタノイル-3(1)-アラキドノイル-グリセリド) の合成

(RS)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール5g (37.8mmol) をDMF50mlに溶解し、氷冷下、60%ナトリウムヒドリドオイル分散1.6g (39.7mmol) を少量ずつ添加する。終了後、10分間攪拌し、ベンジルブロミド4.5ml (37.8mmol) を滴下する。その後、5時間攪拌する。反応終了後、水を加え、酢酸エチルで抽出、水、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、得られた油状物をヘキサン-酢酸エチル (9:1) でシリカゲルクロマトし、油状物質の1(3),2-0-イソプロピリデン-3(1)-ベンジルオキシグリセロール6.5g (77.%収率)を得た。この5.6g (25.2mmol) を酢酸30mlに溶解し、水30mlを加えて、60℃

で1時間反応する。

【0058】

反応液を減圧濃縮後、酢酸エチルで抽出、飽和重ソーラー水、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、油状物3.9gを得た（85%収率）。この3.8g（20.9mmol）を塩化メチレン40mlに溶解し、n-オクタン酸6.9ml（43.9mmol）およびジメチルアミノベンゼン150mgを加え、水冷下WS-DCC8.7g（46mmol）を添加した。2時間後、濃縮し、酢酸エチルで抽出、水、0.5N-NaOH、飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、油状物9.9gを得た。これをTHF100ml-酢酸25mlに溶解し、10%パラジウムカーボン1.3gを加え、終夜、水素存在下反応した。触媒をろ去後、減圧濃縮し、酢酸エチルで抽出、飽和重ソーラー水、飽和食塩水で洗浄した。

【0059】

無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、得られた残渣をヘキサン-酢酸エチル（9:1）でシリカゲルクロマトし、6gの脱ベンジル体を得た（83%収率）。脱ベンジル体136mg（0.39mmol）を塩化メチレン3mlに溶解し、アラキドン酸100mg（0.33mmol）およびジメチルアミノベンゼン3mgを加え、水冷下WS-DCC90mg（0.48mmol）を添加した。2時間後、濃縮し、酢酸エチルで抽出、水、1N-HCl、飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、得られた残渣をヘキサン-酢酸エチル（9:1）でシリカゲルクロマトし、油状物180mgを得た（74%収率）。

【0060】

PMR (CDCl₃) δ: 0.8-1.0(9H, m), 1.2-1.4(22H, m), 1.5-1.8(6H, m), 2.0-2.2(4H, m), 2.3-2.4(6H, m), 2.7-2.9(6H, m), 4.1-4.2(2H, m), 4.28(2H, q), 5.3-5.5(9H, m)。

PAP (1,3-ジパルミトイール-2-アラキドノイル-グリセリド)、PPA (1(3),2-ジパルミトイール-3(1)-アラキドノイル-グリセリド) 及び8P8 (1,3-ジオクタノイル-2-アラキドノイル-グリセリド) についても。先の8A8及び88Aの合成法と同様の方法で得た。

【0061】

実施例3. 1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリド(8A8)を5%以上含むトリグリセリドの製造

イオン交換樹脂担体 (Dowex MARATHON WBA: ダウケミカル、商標) 100gを、Rhizopus delemarリバーゼ12.5%水溶液 (タリバーゼ現末: 田辺製薬(株)) 80mlに懸濁し、減圧下で乾燥させて固定化リバーゼを得た。

次に、実施例1で得たアラキドン酸を40重量%含有するトリグリセリド (TGA40S) 80g、カプリル酸160g、上記固定化リバーゼ12g、水4.8 mlを30°Cで48時間、攪拌 (130rpm) しながら反応させた。反応終了後、反応液を取り除き、活性化された固定化リバーゼを得た。

【0062】

次に、固定化リバーゼ (Rhizopus delemarリバーゼ、担体: Dowex MARATHON WBA、商標) 10gをジャケット付きガラスカラム (1.8 x 12.5cm、容量31.8ml) に充填し、実施例1で得たTGA40Sとカプリル酸を1:2に混合した混合油脂を一定の流速 (4ml/h) でカラムに流し、連続反応を実施することで、反応油脂を400gを得た。なお、カラム温度は40-41°Cとした。得られた反応油脂から未反応のカプリル酸及び遊離の脂肪酸を分子蒸留により取り除き、食用油脂の精製工程 (脱ガム、脱酸、脱臭、脱色) を経て、8A8を含有する油脂 (トリグリセリド) を得た。

【0063】

そして、ガスクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにより、得られた8A8含有油脂 (トリグリセリド) 中の8A8の割合を調べたところ、31.6%であった (なお、8P8、808、8L8、8G8、8D8の割合はそれぞれ0.6、7.9、15.1、5.2、4.8%であった)。

【0064】

トリグリセリドの2-位結合する脂肪酸P、O、L、G、Dはそれぞれパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸を表し、8P8は1,3-カプリロイル-2-パルミトレイル-グリセロール、808は1,3-カプリロイル-2-オレオイル-グリセロール、8L8は1,3-カプリロイル-2-リノレオイル-グリセロール、8G8は1,3-カプリロイル-2- γ -リノレノイル-グリセロール、8D8は1,3-カ

ブリオイル-2-ジホモ- γ -リノレノリル-グリセロールをいう）。なお、得られた8A8含有油脂（トリグリセリド）から定法の高速液体クロマトグラフィーによつて、96モル% 8A8を分離・精製した。

【0065】

実施例4. トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂による脂質代謝遺伝子発現の調節

実施例1で調製したトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂（アラキドン酸含有油脂）の脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響をラットで調べた。6週齢SD系雄ラットを4群に分け、実施例1で調製したアラキドン酸含有油脂を牛脂、オリーブ油、コーン油と適宜配合し、表1に示したアラキドン酸含有量の異なる4種の油脂（0%AA、14.6%AA、26.8%AA及び37.7%AA）を調製し、表2に示した実験食（0%AA、1%AA、2.5%AA及び5%AA）を2週間摂取させた。本実験食は、実験食に占めるアラキドン酸の割合が0, 1, 2.5及び5%になるように、しかし、アラキドン酸以外の主要な脂肪酸が実験食に占める割合がほぼ同一になるように調製した（表3）。

【0066】

食事の摂取はpair-feedingを行い、体重は毎日測定した。なお、各実験食群間で一日の摂取エネルギーが同じになるようにagarで実験食を調製した。実験食摂取2週間後にラットを断頭屠殺し、採取した空腸を、氷冷したジエチルピロカーボネート処理した生理食塩水で灌流し内容物を除き、水分を除いた後重量を測定した。また、肝臓および副睾丸白色脂肪組織については組織全体の重量を測定した。更にChomczynskiらの方法により、空腸中央部、肝臓、副睾丸白色脂肪組織をそれぞれ100mgから総RNAを抽出・調製し、遺伝子発現測定に用いた。また、断頭屠殺に血液を採取し、血清画分のトリグリセリド濃度および総コレステロール濃度については測定キット（それぞれトリグリセリドE-テストワコー及び総コレステロールE-テストワコー）を用いて定量を行った。

【0067】

各組織より抽出した総RNA（10 μ gまたh 30 μ g）を2.2Mホルムアルデヒドゲル含1%アガロースゲルにより電気泳動を行った後、ナイロンメンブレン（HybondN+）

、アマシャム）に一晩20xSSC緩衝液でトランスファーさせた。総RNAをトランスファーしたメンブレンをUltrahybハイブリダイゼーション溶液（Ambion）を用い42℃で2時間プレハイブリダイズを行った後、ランダムプライマー法で³²P標識した各cDNAプローブを用い、更に42℃で16時間以上ハイブリダイゼーションを行った。

【0068】

ハイブリダイゼーション終了後メンブレンをWashing液I（2xSSPE、0.5%SDS）を用い42℃で10分間（2回）インキュベートし、引き続きWashing液III（0.1xSSPE、0.5%SDS）を用い42℃で15分間（1回）インキュベートし、メンブレンの洗浄を行った。洗浄したメンブレン上をイメージングプレート（フジフィルム）に1日から2日間感光させ、メンブレン上のmRNAのシグナル強度をバイオイメージアナライザ-BAS2000（フジフィルム）で解析した。

各測定結果は平均±標準誤差で表し、得られたデータについて分散分析法を用いて検定を行い、これについて有意差が認められた結果については、Tukeyによる多群検定を行った。危険率5%以下のものは有意と見なした。

【0069】

【表1】

表1 アラキドン酸含有量の異なる4種の油脂の脂肪酸組成

油脂	0%AA	14.6%AA	26.8%AA	37.7%AA
牛脂	52.0	34.7	19.4	0
オリーブ油	0	2.9	4.3	10.6
アラキドン酸含有油脂	0	32.9	60.2	84.8
コーン油	48.0	29.4	16.1	4.5
合計 (g)	100.0	100.0	100.0	100.0
ミリスチン酸 (14:0)	1.0	0.8	0.6	0.4
パルミチン酸 (16:0)	15.4	13.9	12.6	10.7
パルミトレイン酸 (16:1)	1.6	1.1	0.7	0.1
ステアリン酸 (18:0)	11.8	10.2	8.7	6.4
オレイン酸 (18:1 ω 9)	37.0	28.1	20.1	14.7
リノール酸 (18:2 ω 2)	26.0	18.8	13.9	9.8
α -リノレン酸 (18:3 ω 3)	1.1	0.7	0.4	0.2
γ -リノレン酸 (18:3 ω 6)	0	0.1	0.2	0.3
DGLA (20:3 ω 6)	0	1.1	2.0	2.8
アラキジン酸 (20:0)	0.2	1.1	1.9	2.6
アラキドン酸 (20:4 ω 6)	0	14.6	26.8	37.7
その他	5.8	9.2	12.1	14.3

DGLA:ジホモ- γ -リノレン酸

【0070】

DGLA:ジホモ- γ -リノレン酸

【表2】

表2 実験食の成分組成

g/kg	0%AA	1%AA	2.5%AA	5%AA
カゼイン(ビタミンフリー)	159	159	159	159
β -コーンスターク	479	439	383	295
0%AA 混合油脂	50			
14.6% 混合油脂		68		
26.8% 混合油脂			93	
37.7% 混合油脂				132
ミネラル類AIN-76	28	28	28	28
ビタミン類AIN-76	8	8	8	8
DL-メチオニン	2	2	2	2
重酒石酸コリン	2	2	2	2
2% Agar	272	294	325	374

【0071】

【表3】

表3 実験食に占める各脂肪酸の割合 (%)

	0%AA	1%AA	2.5%AA	5%AA
ミリスチン酸 (14:0)	0	0.1	0.1	0
パルミチン酸 (16:0)	0.8	0.9	1.2	1.4
パルミトレイン酸 (16:1)	0.1	0.1	0.1	0
ステアリン酸 (18:0)	0.6	0.7	0.8	0.8
オレイン酸 (18:1 ω 9)	1.9	1.9	1.9	1.9
リノール酸 (18:2 ω 2)	1.3	1.3	1.3	1.3
α -リノレン酸 (18:3 ω 3)	0.1	0	0	0
γ -リノレン酸 (18:3 ω 6)	0	0	0	0
DGLA (20:3 ω 6)	0	0.1	0.2	0.4
アラキジン酸 (20:0)	0	0.1	0.2	0.3
アラキドン酸 (20:4 ω 6)	0	1.0	2.5	5.0
その他	0.3	0.6	1.1	1.9

DGLA:ジホモ- γ -リノレン酸

【0072】

DGLA:ジホモ- γ -リノレン酸

実験食摂取2週間後の組織重量及び血清脂質濃度への影響を表4に示した。内臓脂肪に相当する副睾丸白色脂肪組織重量は実験食中のアラキドン酸含有量に依存して低下し、5%AA実験食では有意な減少となった。また、血清総コレステロールおよびトリグリセリド濃度も実験食中のアラキドン酸含有量に依存して有意に低下した。特に血清トリグリセリド濃度の低下は顕著であり、1%AA食群では0%AA食群の53%までに低下した。なお、アラキドン酸負荷による本実験飼育条件下では、過剰なエイコサノイド産生に伴う炎症などの異常な症状は観測されず、トリグリセリドの構成脂肪酸としてアラキドン酸を摂取する限りにおいては何な問題ないことが確認された。

【0073】

【表4】

表4 実験食摂取によるラット体重増加量、相対組織重量及び血清脂質濃度への影響

	0%AA	1%AA	2.5%AA	5%AA
体重増加量 (g/14日)	91±3	90±7	89±10	80±5
摂餌量 (g/日)	27.5±0.3	26.2±0.7	27.4±0.6	26.2±0.6
肝臓重量 (g/100g 体重)	4.0±0.1	3.7±0.3	4.0±0.4	4.2±0.1
副腎丸脂肪組織重量 (g/体重 100g)	1.7±0.1 ^a	1.4±0.2 ^{ab}	1.4±0.1 ^b	1.2±0.1 ^b
血清トリグリセリド濃度 (μmol/dl)	242±19.7 ^a	128±20.3 ^b	112±12.8 ^b	87.0±12.3 ^b
血清総コレステロール濃度 (μmol/dl)	257±6.25 ^a	239±19.2 ^a	209±16.5 ^a	144±14.2 ^b

a, b : 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

【0074】

ラット空腸では、PPAR α mRNA発現量はアラキドン酸含有量が2.5%および5%AA食群で約1.5倍から1.7倍に増大が見られた（図1）。一方、空腸PPAR δ mRNA発現量は餌中のアラキドン酸含有量に依存して低下した。さらに、PPAR α の標的遺伝

子である空腸CRBPII、L-FABP、I-FABPおよびAOX mRNA発現量は摂取するアラキドン酸含量に依存して増加した。空腸から吸収されるレチノールは疎水性の栄養素であるので、細胞質ではほとんどが結合蛋白と結合して存在する。そして、レチノールの細胞内転送およびエステル化に重要な役割を果たすのが、細胞性レチノール結合蛋白質タイプII (CRBPII) である。

【0075】

したがって、アラキドン酸がPPAR α mRNA発現量の増加、さらに、空腸CRBPII mRNA発現量の増加を介して、脂溶性ビタミンを効率的に吸収・代謝することが明らかとなった。以上の結果から、小腸において摂取されたアラキドン酸は直接的またはエイコサノイド類などの前駆体として主にPPAR α のリガントとして機能していることが明らかとなった。

【0076】

肝臓では、PPAR α mRNA発現量は1%AA食群および2.5%AA食群で増加したが、5%AA食群では減少した。しかし、PPAR α 標的遺伝子であるL-FABP、AOXおよびUCP-2 mRNA発現量はアラキドン酸含量に依存して上昇し、5%AA食群で最も高値を示した。これはPPAR α mRNAの変動パターンと異なるが、結果としてアラキドン酸含量は2.5%までは安全でかつ効果的にPPAR α を活性化し、遺伝子発現を調節することができる。以上のことから、脂肪酸合成系の抑制 (PPAR非介在) およびPPAR α の発現量の増加に伴う脂肪酸分解系の亢進 (PPAR介在) を遺伝子レベルで制御し、血中トリグリセリド濃度の低下させることができることが明らかとなった。

【0077】

副睾丸白色脂肪組織では、PPAR α およびPPAR δ mRNA発現量はアラキドン酸含量に依存して有意に低下した。さらに、PPAR δ 標的遺伝子である脂肪細胞特異的脂肪酸結合蛋白質 (aP2) mRNA発現量も濃度依存的に低下した。PPAR δ は脂肪細胞の分化誘導に関与し、白色脂肪組織での脂肪蓄積促進することが知られており、アラキドン酸摂取による副睾丸脂肪組織重量の減少は (表4) 、PPAR δ mRNA発現量の減少を介した、白色脂肪細胞の数およびそのサイズの増大が抑制、つまり、脂肪細胞の分化・熟成化を抑制した。一方、白色脂肪組織AOX mRNA発現量はアラキドン酸含量増加に伴い増加することから、脂肪酸分解系の亢進も認められ

た。

【0078】

実施例5. アラキドン酸含有構造脂質による脂質代謝遺伝子発現の調節

実施例2で化学合成したアラキドン酸を構成脂肪酸とする構造脂質の脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響をラットで調べた。構造脂質の一例として、トリグリセリドの1,2,3-位にパルミチン酸（P）が結合したPPP、トリグリセリドの1,2-位にパルミチン酸が、3-位にアラキドン酸が結合したPPAとトリグリセリドの2,3-位にパルミチン酸が、1-位にアラキドン酸が結合したAPPの等量混合物（化学合成ではPPAとAPPの等量混合物となる、便宜上、等量混合物をPPAとして以後表記する）、そして、トリグリセリドの1,3-位にパルミチン酸が、2-位にアラキドン酸が結合したPAPで効果を比較した。

【0079】

5週齢SD系雄ラットを1群5匹として4群に分け、1週間標準固形飼料にて馴化させた後、アラキドン酸含有構造脂質（PPAまたはPAP）を10%配合した実験食（10%PPA及び10%PAP、表5）を2週間摂取させた。また、対照群はPPPを10%配合した実験食（10%PPP）を用いた。食事の摂取はpair-feedingを行い、体重は毎日測定した。なお、各実験食群間で一日の摂取エネルギーが同じになるようにagarで実験食を調製した。

実験食摂取2週間後にラットを断頭屠殺し、実施例4と同様の方法によって、各組織の採取と総RNAを抽出し、ノーザンプロット法により遺伝子発現解析を実施した。

【0080】

【表5】

表5 実験食の成分組成

	低脂肪	10%PPP	10%PPA	10%PAP
g/Kg 飼料				
カゼイン(ビタミンフリー)	157	157	157	157
β-コーンスターク	526	301	301	301
コーン油	24	24	24	24
PPP		100		
PPA			100	
PAP				100
ミネラル類 AIN-G93	28	28	28	28
ビタミン類 AIN-93	8	8	8	8
DL-メチオニン	2.4	2.4	2.4	2.4
重酒石酸コリン	1.6	1.6	1.6	1.6
2% Agar	253	378	378	378

各飼料にα-トコフェロールを 0.25g/kg diet 添加

【0081】

実験食摂取2週間後の組織重量及び血清脂質濃度への影響を表6に示した。血清トリグリセリド濃度は10%PPP食群で著しく高値を示したが、10%PPAおよび10%PAP食群では低脂肪食群と有意な差はなかった。低脂肪食（2.4%コーン油）に対して同じく10%油脂を付加したにも関わらず、トリグリセリドに結合する脂肪酸のひとつをアラキドン酸に置き換えることで、血清トリグリセリドが有意に低下し、低脂肪食群と同等の値となった。また、血清総コレステロール濃度は10%PPP食群に比べて10%PPAおよび10%PAP食群で低値を示した。

【0082】

【表6】

表6 実験食摂取によるラット体重増加量、相対組織重量及び血清脂質濃度への影響

	低脂肪	10% PPA	10% PPA	10% PPA
体重増加量(g/14日)	71±5 ^a	61±5 ^a	80±4 ^a	67±5 ^{ab}
肝臓重量(g/100g 体重)	4.4±0.3	4.3±0.3	4.2±0.1	3.4±0.8
血清トリグリセリド濃度(μmol/dl)	191±32.3 ^a	316±64.3 ^b	173±6.6 ^a	174±7.5 ^a
血清コレステロール濃度(μmol/dl)	235±7.8 ^a	201±9.2 ^a	150±16.6 ^b	178±15.3 ^{ab}

a, b : 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

【0083】

空腸のPPARの標的遺伝子発現に及ぼす構造脂質の影響を示す（図4）。PPAからは1,3-位特異的臍リパーゼの作用によりパルミチン酸とアラキドン酸が1分子ずつ解離し吸収され、特にPPARリガンド活性が強いアラキドン酸が小腸において

PPAR α リガンドとして作用することから、対照群であるPPP食群と比べて10%PPA食群ではPPARの標的遺伝子の発現量は増大した。一方、PAPからは2分子の解離したパルミチン酸と、1分子の2-アラキドノイルモノグリセロール（2-AG）が生成され、小腸上皮細胞に取り込まれると考えると、パルミチン酸はPPARリガンドとしての作用は弱いことから、対照群であるPPP食群と比べて10%PAP食群ではPPARの標的遺伝子の発現に殆ど影響を及ぼさないと予想したが、結果は全くの逆で、10%PPA食群と同等またはそれ以上に増大した。

【0084】

肝臓のPPAR α mRNA発現量はPAP群食で有意に増大した（図5）。空腸では1,3-位特異的リバーゼに作用により、2-位にアラキドン酸が結合したモノグリセリド（2-AG）の有意な作用を発見したが、肝臓でも同様に効果を示すことを実証した。小腸上皮細胞に取り込まれた2分子のパルミチン酸と1分子の2-AGがトリグリセリドに再構築され（この場合、小腸上皮細胞に存在する内在の他の脂肪酸が1,3-位に結合する可能性もあるが2-位に結合するアラキドン酸は保持される）、カイロミクロンに取り込まれ、リンパ分泌、血流にのって抹消組織に移行し、最後に肝臓に取り込まれる。

【0085】

PAPが有意に肝臓中のPPAR α の発現量を増加させた結果は、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリド構造が肝臓まで保持され機能を発揮することを示し、2-位のアラキドン酸、すなわち、高度不飽和脂肪酸が結合する意義が実証された。なお、油脂負荷2.4%の低脂肪食に対して、構造脂質負荷10%のPPP、PPA及びPAP食（全油脂負荷は12.4%となる）は極端な脂肪負荷ではないため、血清トリグリセリド濃度及び血清総コレステロール濃度ではPPAとPAPとの違いが認められなかったが、遺伝子発現レベルでは明らかな差を認めており、極端な脂質負荷においては血清脂質濃度をPAP（2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリド）が有意に低下させることは明らかである。

【0086】

実施例6. アラキドン酸含有構造脂質による血清脂質低下作用

実施例2で化学合成したアラキドン酸を構成脂肪酸の血清脂質低下作用に及ぼ

す影響を高脂肪食で調べた。構造脂質には、実施例5と同様のPPP、PPA、PAPとトリグリセリドの1,3-位にカプリル酸(8)が結合し、2-位にパルミチン酸が結合した8P8、トリグリセリドの1,2-位にカプリル酸が、3-位にアラキドン酸が結合した88Aとトリグリセリドの2,3-位にカプリル酸が、1-位にアラキドン酸が結合したA88の等量混合物（化学合成では88AとA88の等量混合物となる、便宜上、等量混合物を88Aとして以後表記する）、そして、トリグリセリドの1,3-位にカプリル酸が、2-位にアラキドン酸が結合した8A8で効果を比較した。

【0087】

5週齢SD系雄ラットを1群5匹として8群に分け、1週間標準固形飼料にて馴化させた後、表7及び表8に示した実験食（普通、高TG、7.5%PPP、7.5%PAP、7.5%PPA、7.5%8P8、7.5%8A8および7.5%88A）を2週間摂取させた。なお、高脂肪食の条件として餌に占める油脂の割合を20%とし、飽和脂肪酸が豊富な牛脂をベースとし、必須脂肪酸欠乏を避けるためにコーン油を2%配合した。また、対照群は8P8を18%配合（コーン油2%を加えて20%）した実験食（高TG食 油脂20%食）を用いた。

【0088】

実験食摂取2週間後にラットを断頭屠殺に血液を採取し、血清画分のトリグリセリド濃度および総コレステロール濃度については測定キット（それぞれトリグリセリドE-テストワコー及び総コレステロールE-テストワコー）を用いて定量を行った。

【0089】

【表7】

表7 実験食の成分組成

	普通食	高TG食 油脂20%食	高TG食 7.5%PPP	高TG食 7.5%PAP	高TG食 7.5%PPA
g/Kg 飼料					
カゼイン	200	200	200	200	200
DL-メチオニン	3	3	3	3	3
コーンスターチ	150	150	150	150	150
シュクロース	500	350	350	350	350
セルロースパウダー	50	50	50	50	50
ミネラル類AIN-76	35	35	35	35	35
ビタミン類AIN-76	10	10	10	10	10
重酒石酸コリン	2	2	2	2	2
コーンオイル	20	20	20	20	20
牛脂	30	180	105	105	105
PPP			75		
PAP				75	
PPA					75
8P8					
8A8					
88A					

【0090】

【表8】

表8 実験食の成分組成

	高 TG 食 7. 5%8P8	高 TG 食 7. 5%8A8	高 TG 食 7. 5%88A
g/Kg 飼料			
カゼイン	200	200	200
DL-メチオニン	3	3	3
コーンスターク	150	150	150
シュクロース	350	350	350
セルロースパウダー	50	50	50
ミネラル類 AIN-76	35	35	35
ビタミン類 AIN-76	10	10	10
重酒石酸コリン	2	2	2
コーンオイル	20	20	20
牛脂	105	105	105
PPP			
PAP			
PPA			
8P8	75		
8A8		75	
88A			75

【0091】

実験食摂取2週間後の組織重量及び血清脂質濃度への影響を表9に示した。血清トリグリセリド濃度は高トリグリセリド食群で著しく高値を示した。対照群である7.5%PPP食群では何ら変化を示さなかったのに対して、7.5%PPA食群および7.5%PAP食群で有意に血清トリグリセリドを低下させた。そして、PAPとPPAとの効果は7.5%PAP食群の方が有意な低値を示した。同様の結果がカプリル酸を構成脂肪酸とする構造脂質群（7.5%8P8、7.5%8A8、7.5%88A）でも示された。そして、中鎖脂肪酸を構成脂肪酸とすることで、血清トリグリセリドを低下させる効果を有意に高めることを確認した。また、血清総コレステロール濃度についても同様な結果を得た。

【0092】

なお、アラキドン酸に限らず、高度不飽和脂肪酸にはPPARを介して血清トリグリセリド濃度及び血清コレステロール濃度を調節することが知られており、アラキドン酸を2-位に結合させたと同じように、2-位に高度不飽和脂肪酸が結合した構造脂質でも同様な効果が得られることは明らかである。

【0093】

【表9】

表9 実験食摂取による血清脂質濃度への影響

	普通食	高TG食 油脂20%	高TG食 7.5%PPP	高TG食 7.5%PAP
血清トリグリセリド濃度(μmol/dl)	45.0±5.9 ^a	103.0±5.6 ^b	109.2±6.8 ^b	80.4±3.9 ^c
血清総コレステロール濃度(μmol/dl)	80.2±2.8 ^a	102.4±4.9 ^b	104.3±5.9 ^b	91.7±3.3 ^a
普通食	高TG食 7.5%PPA	高TG食 7.5%8P8	高TG食 7.5%8A8	高TG食 7.5%88A
血清トリグリセリド濃度(μmol/dl)	93.1±1.3 ^d	101.8±5.3 ^b	63.3±4.1 ^e	83.1±3.6 ^c
血清総コレステロール濃度(μmol/dl)	92.4±4.9 ^a	99.7±4.2 ^b	85.6±2.5 ^a	92.9±2.9 ^a

a, b : 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

【0094】

実施例7. トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂（トリグリセリド）配合カプセルの調製例

ゼラチン100重量部及び食添グリセリン35重量部に水を加え50～60℃で溶解し、粘度2000cpのゼラチン被膜を調製した。次に実施例1で得たトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂（トリグリセリド）とビタミンE油0.05重量%を混合して内容物1を調製した。実施例3で得た8A8を32モル%含有する油脂（トリグリセリド）にビタミンE油0.05重量%を配合し、内容物2を調製した。これら内容物1及び2を用いて、常法によりカプセル成形及び乾燥を行い、一粒200mgの内容物を含有するソフトカプセルを製造した。

【0095】

実施例8. トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂（トリグリ

セリド) 摂取後のヒトの血清脂質改善作用

本発明のヒト試験は、ヘルシンキ宣言の精神に則り十分な配慮の下に実施した。まず、試験参加同意の説明を行い、同意を得られた被試者8名に実施例7で調製したトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂カプセル(アラキドン酸として80mg/粒)6粒を1ヶ月間服用させた。カプセル摂取の前後で採血を実施し、血液生化学マーカーを分析した。

【0096】

測定結果を表10に示す。血清トリグリセリド濃度はカプセル摂取により有意に低下した。血清コレステロール濃度は有意に増加したが、悪玉コレステロールであるLDL-コレステロール濃度の増加によるのではなく、善玉コレステロールであるHDL-コレステロール濃度の有意な増加によるものであった。以上より、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂により血清脂質が改善されたことが確かめられた。

【0097】

【表10】

表10 トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂カプセル摂取前後の健康診断結果

	開始前	開始後
身長(cm)	169.8±5.9	169.8±5.9
体重(kg)	65.1±6.5	65.0±5.9
中性脂肪(トリグリセリド)	99.4±28.0 ^a	74.1±17.5 ^b
総コレステロール	175.9±17.6 ^a	184.9±18.6 ^b
HDL-コレステロール	58.5±10.2 ^a	63.1±10.0 ^b
LDL-コレステロール	106.9±19.4	108.3±17.6

a, b : 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

【0098】

実施例9. 8A8含有食用油脂カプセル摂取後のヒトの血清トリグリセリド低下

作用

実施例8と同様に、試験参加同意の説明を行い、同意を得られた被験者8名に実施例7で調製した8A8含有食用油脂カプセル(アラキドン酸として72mg/粒)3粒を1ヶ月間服用させ、カプセル前後の血清トリグリセリド濃度を分析したところ、 16.2 ± 29.3 が 83.3 ± 14.9 と有意に低下した。

【0099】

実施例10. 脂肪輸液剤への使用

実施例3で得た8A8を96%含有する油脂(トリグリセリド)400g、精製卵黄レシチン48g、オレイン酸20g、グリセリン100g及び0.1N苛性ソーダ40mlを加え、ホモジナイザーで分散させたのち、注射用蒸留水を加えて4リットルとする。これを高圧噴霧式乳化機にて乳化し、脂質乳液を調製した。該脂質乳液を200mlずつプラスチック製バッグに分注したのち、121℃、20分間、高圧蒸気滅菌処理して脂肪輸液剤とする。

【0100】

実施例11. ジュースへの使用

β -シクロデキストリン2gを20%エタノール水溶液20mlに添加し、ここにスターで攪拌しながら、実施例1で得たトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂(ビタミンEを0.05%配合)100mgを加え、50℃で2時間インキュベートした。室温冷却(約1時間)後、さらに攪拌を続けながら4℃で10時間インキュベートした。生成した沈殿を、遠心分離により回収し、n-ヘキサンで洗浄後、凍結乾燥を行い、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂を含有するシクロデキストリン包接化合物1.8gを得た。この粉末1gをジュース10Lに均一に混ぜ合わせ、トリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂を含有するジュースを調製した。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はラット空腸のPPAR及び関連遺伝子発現に及ぼすトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂の影響を調べた図である。

【図2】

図2はラット肝臓のPPAR及び関連遺伝子発現に及ぼすトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂の影響を調べた図である。

【図3】

図3はラット副睾丸白色脂肪組織のPPAR及び関連遺伝子発現に及ぼすトリグリセリドの2-位にアラキドン酸が結合した油脂の影響を調べた図である。

【図4】

図4はラット肝臓のPPAR及び関連遺伝子発現に及ぼすアラキドン酸含有構造脂質の影響を調べた図である。

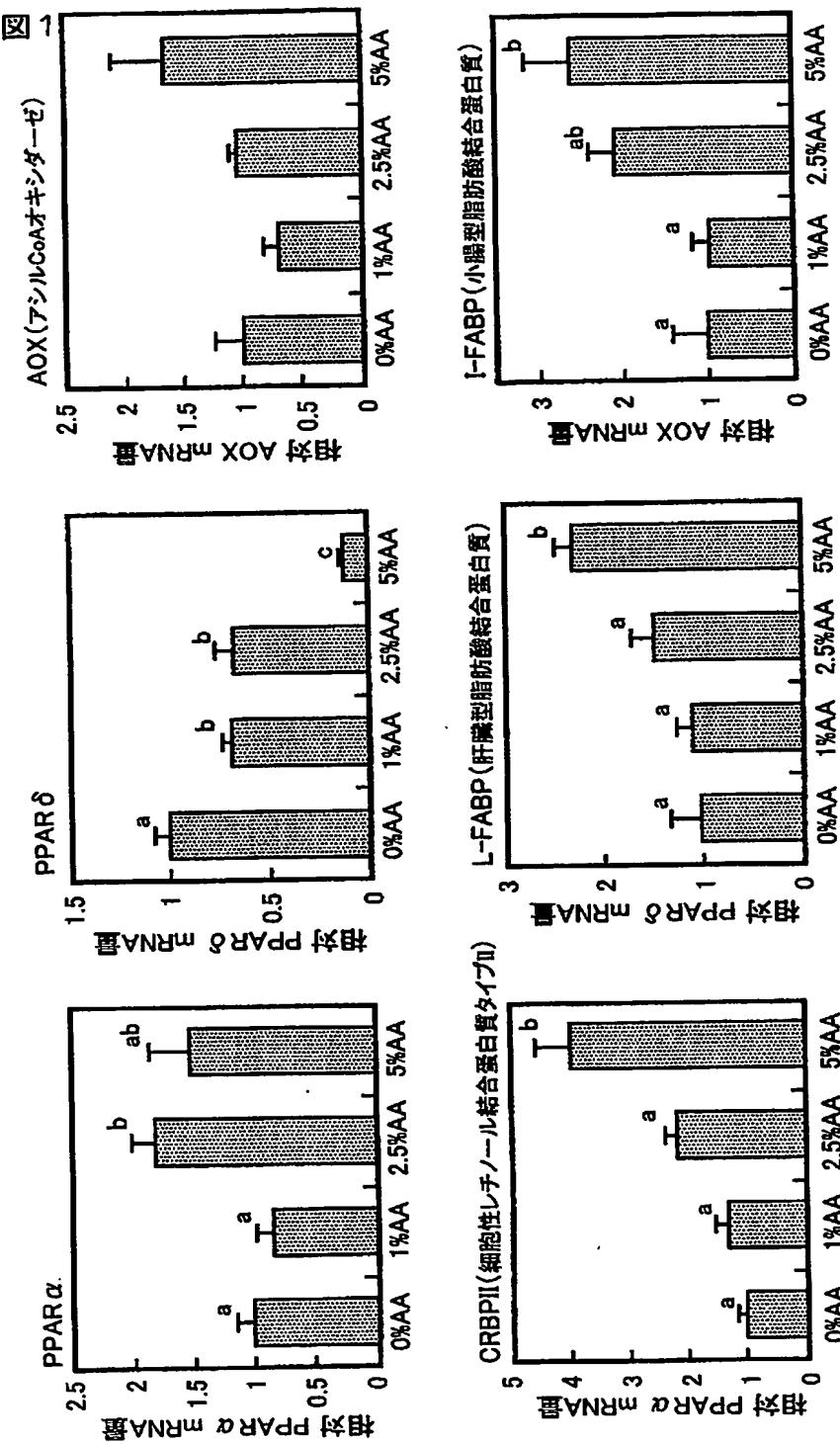
【図5】

図5はラット副睾丸白色脂肪組織のPPAR及び関連遺伝子発現に及ぼすアラキドン酸含有構造脂質の影響を調べた図である。

【書類名】

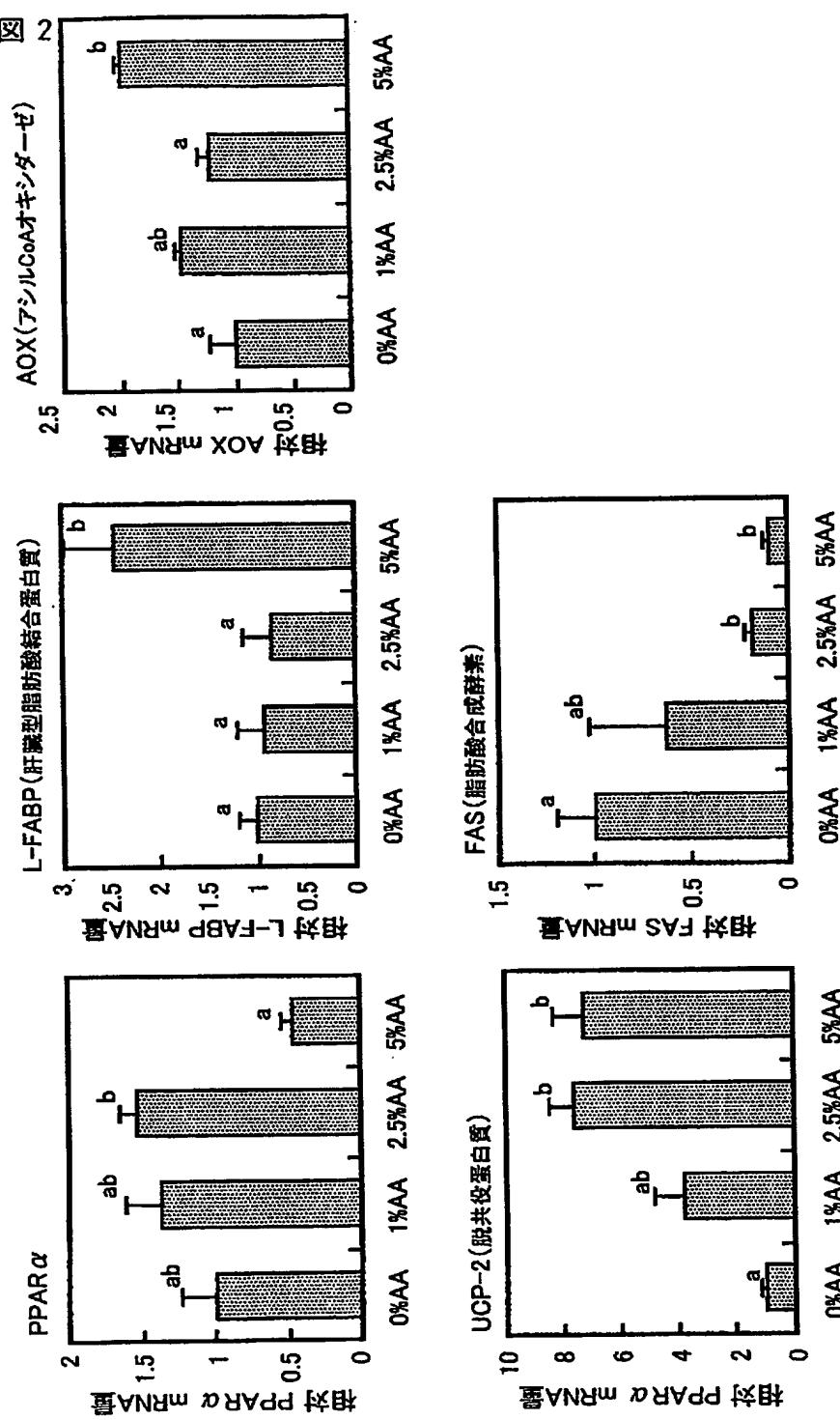
図面

【図 1】



内部標準遺伝子 18S rRNA量で補正し、0%アラキドン酸食群を1とした相対値(平均値±標準誤差, n=5)で表記。a-c: 差があるアルファベット間で有意差あり($p<0.05$, Tukey)

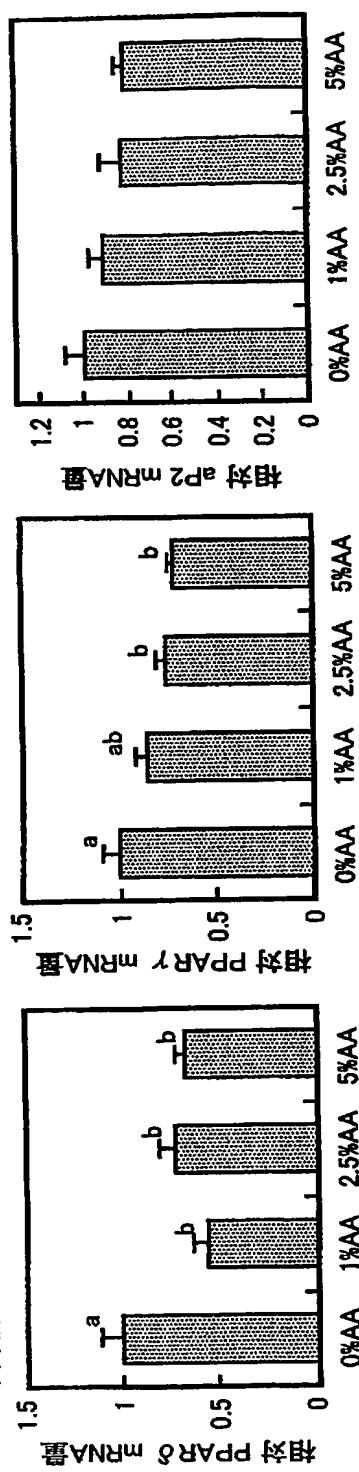
【図2】



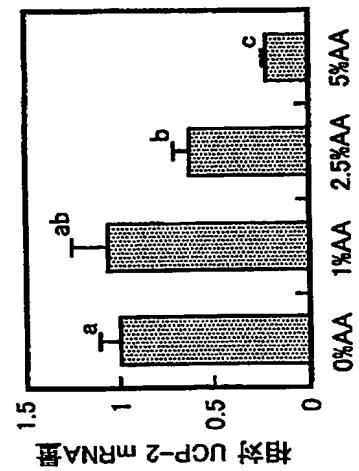
内部標準遺伝子18SrRNA量で補正し、%アラキドン酸群を1とした相対値(平均値±標準誤差, n=5)で表記。a,b:異なるアルファベット間で有意差あり($p<0.05$, Tukey)

【図3】

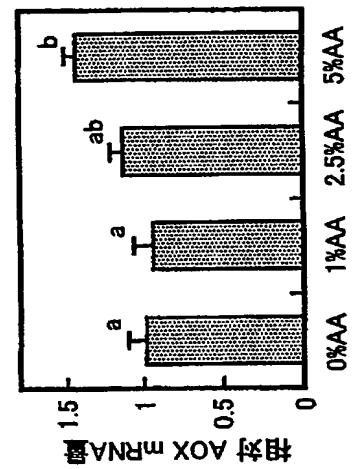
図

3
aP2(脂肪細胞特異的脂肪酸結合蛋白質)PPAR γ 

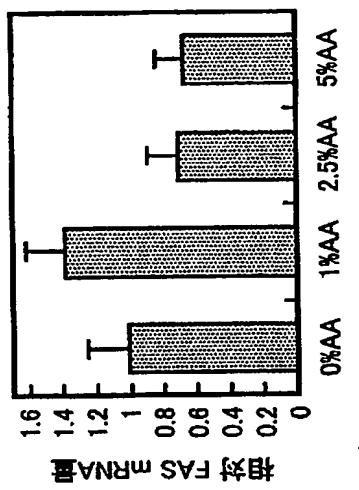
UCP-2(脱共役蛋白質)



AOX(アシルCoAオキシダーゼ)



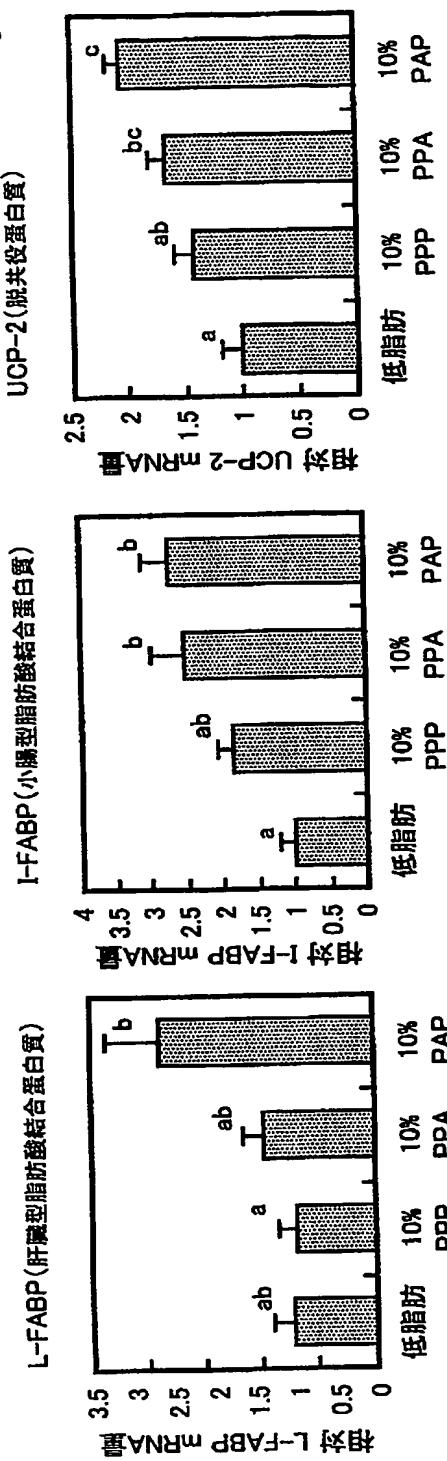
FAS(脂肪酸合成酵素)



内部標準遺伝子18S rRNA量で補正し、%アラキドン酸食群を1とした相対値(平均値±標準誤差, n=5)で表記。a-c: 異なるアルファベット間で有意差あり(p<0.05, Tukey)

【図4】

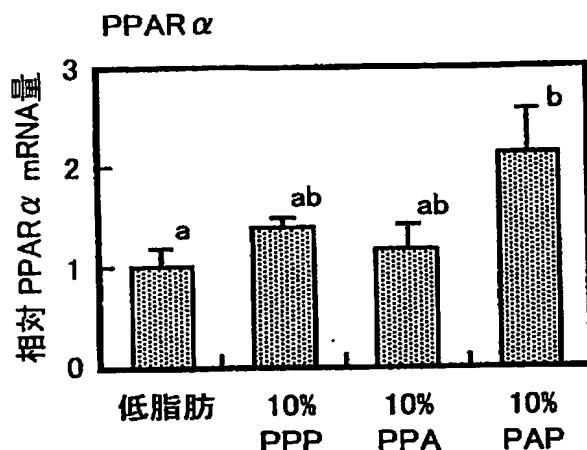
図4



内部標準遺伝子18SrRNA量で補正し、0%アラキドン酸食群を1とした相対値(平均値±標準誤差, n=5)で表記。a-c: 異なるアルファベット間で有意差あり($p<0.05$, Tukey)

【図5】

図5



内部標準遺伝子18SrRNA量で補正し、
0%アラキドン酸食群を1とした相対値
(平均値土標準誤差, n=5)で表記。

a,b: 異なるアルファベット間で有意差
あり($p<0.05$, Tukey)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脂質改善作用を有する新規な組成物の提供。

【解決手段】 トリグリセリドの2-位に高度不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを含んで成る脂質改善剤。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 2003088631
【提出日】 平成15年 4月15日
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003- 88631
【補正をする者】
【識別番号】 000001904
【氏名又は名称】 サントリー株式会社
【代理人】
【識別番号】 100077517
【弁理士】
【氏名又は名称】 石田 敬
【電話番号】 03-5470-1900

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006

【氏名】 秋元 健吾

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院嶋出在家町36

【氏名】 深見 治

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県清水市川原町21番11号

【氏名】 合田 敏尚

【その他】 下記に誤記理由を述べます。 本件出願人代理人は、本件特許出願の手続を受任し、平成15年3月27日に御府に特許出願の手続を探りました。 しかしながら、本件出願後に出願人より、本件出願の発明者のうち、願書に記載の「京都府南区吉祥院嶋出在家町36」は、正しくは『京都府京都市南区吉祥院嶋出在家町36』である旨の連絡を受けました。 これは、出願人との間で確認が不十分のまま、特許出願の手続を探ったことから生じたものであります。 上記の通り、本出願の発明者のうち、「京都府南区吉祥院嶋出在家町36」は正しくは『京都府京都市南区吉祥院嶋出在家町36』であります。 何卒、本件発明者の記載の誤りの訂正をご容認賜りますようお願い申し上げる次第であります。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 2003088631
【提出日】 平成15年 6月12日
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003- 88631
【補正をする者】
【識別番号】 000001904
【氏名又は名称】 サントリー株式会社
【代理人】
【識別番号】 100077517
【弁理士】
【氏名又は名称】 石田 敬
【電話番号】 03-5470-1900

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-1006

【氏名】 秋元 健吾

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院嶋出在家町 36

【氏名】 深見 治一

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県清水市川原町 21 番 11 号

【氏名】 合田 敏尚

【その他】 下記に誤記理由を述べます。 本件出願人代理人は、本件特許出願の手続を受任し、平成 15 年 3 月 27 日に御庁に特許出願の手続を探りました。 しかしながら、本件出願後に出願人より、本件出願の発明者のうち、願書に記載の「深見 治」は、正しくは『深見 治一』である旨の連絡を受けました。 これは、代理人が本件出願の依頼時に、発明者の氏名を誤認し、また、その後本件出願人との間で確認が不十分のまま、特許出願の手続を探ったことから生じたものであります。 上記の通り、本件出願の発明者のうち、「深見 治」は正しくは『深見 治一』であります。 何卒、本件発明者の記載の誤りの訂正をご容認賜りますようお願い申し上げる次第であります。

【プルーフの要否】 要

特願 2003-088631

出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

氏 名 サントリー株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.